



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift  
(10) DE 42 39 816 A 1

(51) Int. Cl. 5:  
A 61 K 37/02

(21) Aktenzeichen: P 42 39 816.8  
(22) Anmeldetag: 26. 11. 92  
(43) Offenlegungstag: 1. 6. 94

DE 42 39 816 A 1

(71) Anmelder:

Institut für Bioanalytik gGmbH, 3400 Göttingen, DE

(72) Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.  
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,  
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,  
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Böhm, B., Dipl.-Chem.Univ.  
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 81879 München

(72) Erfinder:

Keller, Bernhard U., Dr., 3400 Göttingen, DE;  
Konnerth, Arthur, Prof. Dr., 3400 Göttingen, DE

(54) Arzneimittel zur Behandlung des zentralen Nervensystems

(57) Erfindungsgemäß verwendet man ein Toxin aus der Gruppe Joro Spider Toxin (JSTX), Spider Toxin NSTX und Argiatoxin zur reversiblen Hemmung oder Verlängsamung der glutamatininduzierten synaptischen Erregungsübertragung im zentralen Nervensystem von Säugern oder JSTX zur pharmakologischen Unterscheidung verschiedener Unterarten von Glutamat-Rezeptorkanälen vom AMPA/Kainat-Typ und zur pharmakologischen Hemmung hoch Kalzium-permeabler AMPA/KA-Rezeptorkanäle. Ein Arzneimittel zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems enthält als wirksames Agens JSTX, NSTX oder/und Argiatoxin zusammen mit üblichen pharmazeutischen Träger- und Hilfsstoffen.

DE 42 39 816 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingesetzten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 04.94 408 022/109

10/43

DE 42 39 816 A1

## Beschreibung

- Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Toxins aus der Gruppe Joro Spider Toxin (JSTX), Spider Toxin NSTX und Argiotoxin zur reversiblen Hemmung oder Verlangsamung der glutamatinduzierten synaptischen Erregungsübertragung sowie ein entsprechendes Arzneimittel.
- Die synaptische Erregungsübertragung im zentralen Nervensystem von Säugetieren (CNS) wird überwiegend durch Glutamat-Rezeptorkanäle vom AMPA/KA-Typ ( $\alpha$ -Amino-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat/Kainat-Typ) vermittelt (Collingridge, G.L. und Bliss T.V.P. (1987), TINS 10, (1987), 288; Mayer, M.L. und Westbrook, G.L., Prog. Neurobiol. 28 (1987), 197–276; Monaghan et al, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29 (1989), 356–402).
- Es wurde nun kürzlich festgestellt, daß verschiedene neurologische Krankheiten, wie z.B. Parkinson'sche Krankheit und Alzheimer'sche Krankheit (T. Klockgether, L. Turski, T. Honore, Z.M. Zhang, D.M. Gash, R. Kurhan und J.T. Greenamyre, Ann. Neurol. 30(5), (1991), 717; P.A. Loschmann, K.W. Lange, M. Kunow, K.J. Rettig, P. Jahnig, T. Honore, L. Turski, H. Wachtel, P. Jenner und C.D. Marsden, J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect. 3(3), (1991), 203; D. Dewar, D.T. Chalmers, A. Shand, D.I. Graham und J. Mc Culloh, Ann. Neurol. 28(6), (1990), 805; P.J. Harrison, A.J. Barton, A. Majlalahim und R.C. Pearson, Neuroreport 1(2), (1990), 149) oder einige Arten von Epilepsie (J.W. McDonald, E.A. Garofalo, T. Hood, J.C. Sackellares, S. Gilman, P.E. McKeever, J.C. Troncoso und M.V. Johnston, Ann. Neurol. 29(5), (1991), 529; D.A. Hosford, B.J. Crain, Z. Cao, D.W. Bonhaus, A.H. Friedman, M.M. Okazaki, J.V.N. Adler und J.O. McNamara, J. Neurosci 11(2), (1991), 428; R. Dingledine, C.J. McBain, J.O. McNamara, Trends Pharmacol. Sci. 11(8), (1990), 334; S.C. Pedder, R.I. Wilcox, J.M. Tuchek, D.D. Johnson und R.D. Crawford, Eur. J. Pharmacol. 175(1), (1990)) ebenfalls mit Glutamat-Rezeptoren vom Typ AMPA/KA verbunden sind. So wurde bereits von Difazio et al, Neurology 42(2) (1992), 402, eine Untersuchung veröffentlicht, die eine Behandlungsmöglichkeit der Parkinson'schen Krankheit mit AMPA/KA-Rezeptor-Antagonisten belegt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, als Arzneimittel geeignete weitere Antagonisten der Glutamat-Rezeptorkanäle vom AMPA/KA-Typ bereitzustellen. Solche Antagonisten sollten dabei möglichst auch spezifisch für bestimmte Rezeptorkanäle sein.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß Joro Spider Toxin (JSTX), das Toxin der Spinne Nephila clavata, sowie die nah verwandten Athropoden-Toxine NSTX und Argiotoxin als Antagonisten der synaptischen Erregungsübertragung und von Glutamat-vermittelten Strömen in verschiedenen Typen von Neuronen (Kawai, N., Miwa, A., Saito, M., Pan-Hou, H.S., Yoshioka, M., J. Physiol. 29, 228–231 (1984); Kawai, N., Niwa, A., Abe, T., Brain Res. 247, 169–171 (1982); Kawai, N., J. Toxicol.-Toxin Rev. 10 (2), 131–157 (1991); Akaike, N., Kawai, N., Kiskin, N.I., Kljuchko, E.M., Krishnal, O.A., Tsyndrenko, O.Y., Neurosci. Letters, Vol. 79, 326–330 (1987); Saito, M., Sahara, Y., Miwa, A., Shimazaki, K., Najima, T., Kawai, N., Brain Res. 481, 16–24 (1989); Ajima, A., Hensch, T., Kado, R.T., Ito, M., Neurosci. Res. 12, 281–286 (1991); Usherwood, R.N.R. Excitatory Amino Acids, New York (1991)) wirken und dabei Kainat-vermittelte Reaktionen verschiedener Untereinheiten eines in Xenopus Oocyten exprimierten Glutamat-Rezeptorkanals blockieren. Die reversible Blockierung durch JSTX, NSTX und Argiotoxin ist spezifisch für Untereinheiten bzw. Untereinheitskombinationen mit einer rektifizierenden Strom-Spannungsbeziehung, nämlich GluR1, GluR3, GluR4 und GluR1,3. Diese Untereinheiten oder Untereinheitskombinationen sind stark kalziumpermeabel.

Die Blockierung erfolgt bereits bei submikromolaren Konzentrationen der erfundungsgemäß verwendeten Toxine in den durchgeföhrten Experimenten. Es ist außerdem festgestellt worden, daß eine Veränderung in einer einzigen Aminosäure in der membran durchdringenden Region M2 der Rezeptorkanäle (Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S.W., Heinemann, S., Nature 342, 643 (1989); Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., Heinemann, S., Science 249, 1033 (1990); Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T.A., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Science 249, 556 (1990); Nakanishi, N., Schneider, N.A., Axel, R., Neuron 5, 569–581 (1990); Bettler, B., Egebjerg, J., Sharma, G., Hermans-Borgmeyer, I., Moll, C., Stevens, C.F., Heinemann, S., Neuron 8, 257–265 (1992); Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S., Nature 351, 745–748 (1991)) zu einer Veränderung der Form der Stromspannungskurve und damit auch zu einer Veränderung der Blockierbarkeit durch die Toxine führt. Auch die Kalziumpermeabilität ist davon betroffen. Die blockierende Wirkung von JSTX, NSTX und Argiotoxin ist reversibel und nicht kompetitiv gegenüber Kainat im Hinblick auf die Bindungsstelle des Antagonisten.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung eines Toxins aus der Gruppe Joro Spider Toxin (JSTX), Spider Toxin NSTX und Argiotoxin zur Hemmung oder Verlangsamung der glutamatinduzierten synaptischen Erregungsübertragung im zentralen Nervensystem von Säugern. Aufgrund ihrer Spezifität für spezielle Untereinheiten oder Untereinheitskombinationen von Glutamat-Rezeptorkanälen sind die erfundungsgemäß verwendeten Toxine klinisch wertvolle Arzneistoffe, die es ermöglichen, die Erregungswirkung in spezifischen neuronalen Populationen des zentralen Nervensystems zu reduzieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Toxins aus der Gruppe Joro Spider Toxin (JSTX), Spider Toxin NSTX und Argiotoxin zur pharmakologischen Unterscheidung verschiedener Untereinheiten von Glutamat-Rezeptorkanälen vom AMPA/KA-Typ. Aufgrund der Spezifität für bestimmte Untereinheiten wie oben bereits ausgeführt, können JSTX, NSTX und Argiotoxin auch bei der Erforschung und Charakterisierung weiterer Rezeptoren Anwendung finden.

Die funktionellen Eigenschaften der AMPA/KA-Rezeptorkomplexe hängen entscheidend von ihrer Zusammensetzung aus Untereinheiten ab (M. Hollmann et al, Nature 342, (1989), 643; Hollmann, M., Hartley, M., und Heinemann, S., Science 252, (1991), 851–853; K. Keinänen et al, Science 249, (1990), 556; J. Boulter et al, Science 249, (1990), 1033; Nakanishi, N., Schneider, N.A. und Axel, R. Neuron 5, (1990), 569–581). So wurde beispielsweise festgestellt, daß AMPA/KA-Rezeptoren, welche die Untereinheit GluR2 enthalten, eine lineare Stromspannungsbeziehung zeigen und eine niedrige Kalziumpermeabilität aufweisen, wogegen rekombinante Rezeptoren,

## DE 42 39 816 A1

welche hergestellt wurden aus den Untereinheiten GluR1 und GluR3 oder die Untereinheiten-Kombination GluR1,3 eine nach innen rektifizierende Stromspannungsbeziehung aufweisen und eine hohe Permeabilität für Kalziumionen zeigen (Egebierg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I. und Heinemann, S. *Nature* 351 (1991), 745–748; Hume, R.L., Dingledine, R. und Heinemann, S. *Science* 253, (1991), 1028–1031; Burnashev, N., Monyer, H., Seuberg, P. und Sakmann, B. *Neuron* Vol. 8 (1992), 189 198). Trotz dieser starken funktionellen Unterschiede sind alle Untereinheitskombinationen der AMPA/KA-Rezeptoren sehr sensitiv gegen Chinaxalindine, z.B. 5 6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-dion, CNQX, die am besten bekannten spezifischen Antagonisten der glutamatergen synaptischen Erregungsübertragung im Gehirn (T. Honore, S.N. Davies, J. Dreyer, E.J. Fletcher, P. Jacobson, D. Losge und F.E. Nielsen, *Science* 241, (1988), 701). Demgegenüber ermöglicht die Verwendung von JSTX als Antagonist eine Unterscheidung der verschiedenen Rezeptoruntereinheiten.

10 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde also festgestellt, daß JSTX, NSTX und Argiotoxin potente untereinheitsspezifische Antagonisten für verschiedene AMPA/KA-Rezeptor-Untereinheiten bzw. Untereinheitskombinationen und zwar von hoch Kalzium-permeablen Rezeptorkanälen sind. Sie binden mit hoher Affinität an eine Stelle des Rezeptorkomplexes, die verschieden ist von der Bindungsstelle von klassischen AMPA/KA-Rezeptor-Agonisten, wie Kainat oder Glutamat.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung eines Toxins aus der Gruppe JSTX, NSTX und Argiotoxin zur Hemmung hoch Kalzium-permeabler AMPA/KA-Rezeptorkanäle.

Auf den oben genannten Wirkungen und der Tatsache, daß AMPA/KA-Rezeptoren bei verschiedenen neurologischen Krankheiten eine wichtige Rolle spielen, basiert ein wiederum weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, nämlich ein Arzneimittel zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems, welches 20 als wirksames Agens mindestens ein Toxin aus der Gruppe JSTX, NSTX und Argiotoxin zusammen mit üblichen pharmazeutischen Träger- und Hilfsstoffen enthält.

Die folgenden Beispiele erläutern in Verbindung mit den Figuren die Erfindung weiter.

Fig. 1 zeigt die Ergebnisse des Experiments zur Blockierung der AMPA/KA-Kanal-Untereinheitskombination GluR1 durch JSTX.

Fig. 2 in Verbindung mit Tabelle 1 zeigt sowohl schematisch das experimentelle Protokoll als auch die 25 experimentellen Ergebnisse der Wirkung von JSTX auf verschiedene Rezeptor-Kanal-Untereinheiten.

Fig. 3a zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der Glutamat-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 – GluR6 in der vermutlichen, die Membran durchdringenden Region M2.

Fig. 3b und c zeigen, daß die Wildtyp-Rezeptorkombination GluR1,3 durch JSTX blockiert wird, eine mutierte 30 Rezeptorkombination GluR1,3 (Q590R) dagegen nicht.

## Beispiele

Herstellung und Kultivierung von *Xenopus Oocytes* erfolgte wie von Methfessel et al., *Pflügers Arch.* 407, (1986), 577 beschrieben. Kurz zusammengefaßt wurden Oocytes von Fröschen entfernt und am selben Tag mit zwei ng cRNA kodierend für die verschiedenen Rezeptoruntereinheiten, Untereinheitskombinationen oder -mutanten injiziert. Einen Tag später wurden Oocytes in Kollagenase (*Clostridiopeptidase A*) von *Clostridium histolyticum* Typ I (Sigma, BRD) 1 bis 4 Std. inkubiert und verbleibende Follikelzellschichten von Hand gehäutet. Nach zwei bis drei Tagen wurden die gehäuteten Oocytes für Experimente verwendet.

Strommessungen wurden durchgeführt unter Verwendung des 2-Elektroden-Spannungsklemmen-Systems Turbo Tech 01C ("npi electronic", Tamm, BRD). Während der Messungen wurde die Aufzeichnungskammer kontinuierlich mit Salzlösungen gespült und auf Raumtemperatur (21–24°C) gehalten. Normale Salzlösung enthielt: NaCl 115 mM, KCl 2,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, 10 mM HEPBS (pH 7,2, NaOH). Spülösungen enthielten außerdem 150 µM Niflussäure (Sigma, BRD) um die Zwischenkomponente von intrinsischen Ca<sup>2+</sup> aktivierte Chloridströmen in *Xenopus Oocytes* zu blockieren. Die Aufzeichnungselektroden bestanden aus feinen Glasplatten (1–2 MΩ) gefüllt mit 2 M KCl. Die Signale wurden bei 0,1–5 kHz mit einem 8-Pol Bessel Filter (Frequency Devices, MA, USA) gefiltert und auf Videobändern durch ein PCM/VCR-Aufzeichnungsmittel aufgezeichnet (Instrutech, NY, USA). Die für die Analyse verwendete Software wurde entweder von Instrutech oder Luigs und Neumann (Ratingen, BRD) erhalten.

## Beispiel 1

## Blockierung von Kainat-vermittelten Strömen durch AMPA/KA-Rezeptorkanäle vom Typ GluR1 durch JSTX

Fig. 1a zeigt die chemische Struktur des Joro Spider Toxins, das in seiner synthetischen Form (RBI, Natick, MA, USA) für die Experimente in dieser Patentanmeldung verwendet wurde. Fig. 1b zeigt Kainat-induzierte Ströme, die gemessen wurden in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmenkonfiguration während Verabreichung von 300 µM Kainat (KA; links) und 300 µM Kainat, 0,5 µM JSTX (KA, JSTX; rechts). Die Verabreichung der Droge erfolgte durch schnelle Perfusion im Bad, was zu einem kompletten Wechsel der Badlösung innerhalb von 3 Sekunden führte. Das Membranpotential wurde bei -100 mV während des Experiments gehalten. Fig. 1c zeigt Dosiswirkungskurven für den Rezeptor GluR1. Für dieses Experiment wurde JSTX in steigenden Konzentrationen beginnend mit 10 nM bis zu einem Maximum von 1 µM angewandt. Der blockierende Effekt wurde 3 Minuten nach der JSTX-Anwendung bestimmt. Die resultierende Dosiswirkungskurve wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate angepaßt, woraus sich eine halbmaximale Inhibition IC<sub>50</sub> von 40 nM und ein Hill-Koeffizient H = 0,98 für dieses Experiment ergab.

Fig. 1d zeigt die Dosiswirkungskurven für Kainat (10 µM – 1mM, GluR1) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von 0,2 µM JSTX. Der maximale Kainat-induzierte Strom wurde reduziert in Anwesenheit des

## DE 42 39 816 A1

Toxins, jedoch waren die  $IC_{50}$ -Werte im wesentlichen unbeeinflußt (Kontrolle:  $IC_{50} = 29 \mu M$ ;  $0.2 \mu M$  JSTX:  $IC_{50} = 20 \mu M$ ).

Fig. 1e zeigt den blockierenden Effekt von JSTX auf eine Oocyte, die den AMPA/KA-Rezeptor GluR1 exprimiert. Die Kontrollspur (links) zeigt die charakteristische, nicht-desensibilisierende Stromantwort, die durch Anwendung von Kainat auf eine Oocyte, an die eine Spannung von  $-100 mV$  angelegt wurde, erhalten wurde. Zugabe von JSTX zu dem Kainat-enthaltenden Perfusionsmedium wirkte eine Blockierung (rechte Spur v. n Fig. 1b), die sich über einen Zeitraum von mehreren Minuten entwickelte. Eine ähnliche langsame Entwicklung der Blockierung wurde in Oocytenten beobachtet, die vorinkubiert wurden in Toxin enthaltendem Medium einige Minuten vor der Zugabe von Kainat, was in Übereinstimmung ist mit der früheren Annahme, daß die Blockierung anwendungsabhängig ist (Priestley, T., Woodruff, G.N., Kemp, J.A., Br.J.Pharmacol. 97, 1315–1323 (1989)). In Oocytenten, die bei negativen Spannungen gehalten wurden, war die JSTX-Blockierung nur teilweise reversibel (weniger als 60% Erholung nach 5 Minuten kontinuierlicher Perfusion mit Kontrolllösung). Eine effektivere Erholung (80 bis 95% des Kontrollwertes) wurde erhalten, wenn die Oocyte an eine Spannungsquelle mit  $0 mV$  60 Sekunden in Anwesenheit von Kainat angeschlossen wurde, was auf eine Spannungsabhängigkeit der blockierenden Wirkung von JSTX schließen läßt (Priestley, T., Woodruff, G.N., Kemp, J.A., Br.J.Pharmacol. 97, 1315–1323 (1989)). Weitere Eigenschaften der JSTX-Blockierung sind in den Fig. 1c und 1d gezeigt. Fig. 1c zeigt die hohe Affinität der Toxinblockierung. Die Konzentration, die 50% der Kainat-vermittelten Stromantwort ( $IC_{50}$ ) durch GluR1 inhibierte, war ungefähr  $40 nM$  JSTX.

Fig. 1d zeigt eine Dosiswirkungsbeziehung für Kainat-vermittelte Ströme in der Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von  $0.2 \mu M$  JSTX. Die  $IC_{50}$ -Werte (die Konzentration von Kainat, die eine halbmaximale Antwort hervorruft) blieben praktisch unbeeinflußt von der Anwesenheit von JSTX (Kontrolle –  $29 \mu M$ ;  $0.2 \mu M$  JSTX –  $20 \mu M$ ; GluR1). Dies läßt annehmen, daß die JSTX-Bindungsstelle nicht mit der Agonistenbindungsstelle übereinstimmt.

Analoge Effekte, wie in diesem Beispiel beschrieben, wurden unter Verwendung von NSTX und Argiotoxin erhalten.

## Beispiel 2

## Vergleich des Blockierungseffekts von JSTX auf verschiedene Rezeptor-Untereinheitskombinationen

Die verschiedenen Rezeptorkombinationen wurden in Xenopusoocytenten wie oben beschrieben exprimiert. Im Fall der Rezeptorkombinationen GluR1,2 und GluR3,2 wurde die mRNA in einem Verhältnis von 1 : 10 injiziert mit einer 10fach höheren Konzentration von GluR2, um die Bildung von sowohl GluR1 oder GluR3 homooligomeren Rezeptoren zu verhindern. Das Verhältnis von injizierter mRNA der mutierten Untereinheitskombinationen GluR1,3 (Q590R) war 1 : 2, für GluR3,3 (Q590R) war das Verhältnis 1 : 4, um eine lineare Strom-Spannungsbeziehung zu erhalten. Im Fall der Rezeptortypen GluR6 (R591) und GluR6 (R691Q) wurden die Oocytenten in Concanavalin A (10 mM) vorinkubiert, um einen Anstieg der Kainat-induzierten Stromantwort zu erhalten (Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S., Nature 351, 745–748 (1991)).

Fig. 2 und Tabelle 1 zeigen die Untereinheitspezifität der JSTX-Blockierung. Rezeptoren, die zusammengezett sind aus den Untereinheiten GluR1, GluR3, GluR4 und die Untereinheitskombination GluR1,3 wurden durch das Toxin mit einer Affinität im nanomolaren Konzentrationsbereich blockiert. Dagegen wurden die Kombinationen GluR1,2 (mRNA-Verhältnis 1 : 10), GluR3,2 (1 : 10) und GluR6 nicht blockiert durch Konzentrationen bis zu  $1 mM$  JSTX (Tabelle 1). Fig. 2 vergleicht den Effekt von  $0.5 \mu M$  JSTX auf Kainat hervorgerufene Ströme für die Rezeptoren GluR3 und GluR1,2. Die Dosiswirkungskurve der JSTX-Blockierung für GluR3 ist im unteren Bereich von Fig. 2a gezeigt. Die  $IC_{50}$ -Werte für JSTX wurden mit  $50 nM$  gemessen ( $n = 4$ ). Es existierte eine klare Korrelation zwischen JSTX-sensitiven und nicht-sensitiven AMPA/KA-Rezeptorkombinationen und der Form ihrer Strom-Spannungskurven (Tabelle 1). Alle Untereinheitskombinationen mit einer nach innen gerichteten rektifizierenden Strom-Spannungsbeziehung wurden durch nanomolare Konzentrationen von JSTX blockiert, während Rezeptorkombinationen mit einer linearen Strom-Spannungsbeziehung nicht durch solche niedrigen Konzentrationen des Toxins beeinflußt wurden. Ähnliche Untereinheits-spezifische Effekte konnten erhalten werden mit Argiotoxin, NSTX und dem synthetischen JSTX-Analogon Naphthylspermin (Nasprom).

In Fig. 2 werden desweiteren gezeigt: im oberen Bereich der Fig. 2a: Kontrollspuren ( $300 \mu M$  Kainat) und Spuren, welche erhalten wurden unter Anwendung von  $300 \mu M$  Kainat,  $0.5 \mu M$  JSTX für Rezeptor GluR3. Die Ströme wurden zu 90% blockiert durch Anwendung von  $0.5 \mu M$  Toxin. Der untere Bereich zeigt, wie bereits oben angesprochen, die gemittelten Dosiswirkungskurven für Rezeptor GluR3. Jeder Datenpunkt repräsentiert im Mittel 4 Experimente; die Stromwerte wurden auf ihre Kontrollantwort normalisiert ( $0 \mu M$  JSTX). Fig. 2b zeigt im oberen Teil Kainat-induzierte Ströme vor und nach Anwendung von  $0.5 \mu M$  JSTX auf einen Oocyte, der die Rezeptortypen GluR1,2 exprimiert. Um die Bildung von GluR1 Homooligomeren zu unterdrücken, wurde die Untereinheitskombination GluR1,2 gemäß einem mRNA-Verhältnis GluR1:GluR2 von 1 : 10 exprimiert. Der untere Bereich von Fig. 2b zeigt die gemittelten Stromantworten, welche erhalten wurden für die Untereinheitskombination GluR1,2 ( $n = 6$ ) nach JSTX-Anwendung. Der kleine Rückgang der Stromantworten kann leicht erklärt werden durch einen allgemeinen "run down" der Stromantwort und wurde auch in Abwesenheit des Toxins beobachtet.

63

## DE 42 39 816 A1

Tabelle 1

| Rezeptorkombination | Blockierungswirkung von<br>0,5 μM JSTX | I/V Kurve      | Zahl der Zellen | Kalziumpermeabilität |
|---------------------|--|----------------|-----------------|----------------------|
| <b>Wildtyp:</b>     |  |                |                 |                      |
| GluR1               | 88 ± 9 %                               | rektifizierend | 13              | hoch                 |
| GluR3               | 96 ± 3 %                               | rektifizierend | 7               | hoch                 |
| GluR1,3             | 87 ± 22 %                              | rektifizierend | 9               | hoch                 |
| GluR1,2             | keine Blockierung                      | linear         | 5               | niedrig              |
| GluR2,3             | keine Blockierung                      | linear         | 5               | niedrig              |
| GluR4               | 82 ± 12 %                              | rektifizierend | 5               | hoch                 |
| GluR6 (R591)        | keine Blockierung                      | linear         | 5               | hoch                 |
| <b>Mutanten:</b>    |  |                |                 |                      |
| GluR2 (R586Q)       | 72 ± 14 %                              | rektifizierend | 5               | hoch                 |
| GluR1,2 (R586Q)     | 63 ± 15 %                              | rektifizierend | 5               | hoch                 |
| GluR1,3 (Q590R)     | keine Blockierung                      | linear         | 7               | niedrig              |
| GluR3,3 (Q590R)     | keine Blockierung                      | linear         | 6               | niedrig              |
| GluR6 (591Q)        | 81 ± 10 %                              | rektifizierend | 6               | hoch                 |

## Beispiel 3

## Eine Aminosäure ist bestimmd für die untereinheitspezifische JSTX-Blockierung

Fig. 3 zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen von Glutamat-Rezeptoruntereinheiten GluR1–GluR6 in der angenommenen, die Membran durchdringenden Region M2 ( Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S.W., Heinemann, S., Nature 342, 643 (1989); Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., Heinemann, S., Science 249, 1033 (1990); Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T.A., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Science 249, 556 (1990); Nakanishi, N., Schneider, N.A., Axel, R., Neuron 5, 569–581 (1990); Bettler, B., Egebjerg, J., Sharma, G., Hermans-Borgmeyer, I., Moll, C., Stevens, C.F., Heinemann, S., Neuron 8, 257–265 (1992); Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S., Nature 351, 745–748 (1991)). Die Aminosäuresequenz in dieser Region ist hochkonserviert in den Rezeptoruntereinheiten GluR1–GluR4, die zu einer Glutamat-Rezeptorunterfamilie gehören. Die Sequenz von GluR6 ist weniger konserviert, da GluR6 zu einer anderen Rezeptorunterfamilie gehört (Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S., Nature 351, 745–748 (1991); Bettler, B., Egebjerg, J., Sharma, G., Hermans-Borgmeyer, I., Moll, C., Stevens, C.F., Heinemann, S., Neuron 8, 257–265 (1992); Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S., Nature 351, 745–748 (1991)). Durch Anwendung von gerichteter Mutagenese konnte gezeigt werden, daß der Austausch einer einzigen Aminosäure in der Membran-durchdringenden Region M2 verantwortlich ist für die Form der Stromspannungskurve, und in einigen, jedoch nicht allen Glutamat-Rezeptoren, diese die Kalziumpermeabilität der Glutamat-Rezeptorkanäle reguliert (Hume, R.I., Dingledine, R., Heinemann, S.F., Science 253, 1028–1031 (1991); Verdoorn, T.A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P.H., Sakmann, B., Science 252, 1715–1718 (1991); Egebjerg, J. and Heinemann, S., PNAS, in press; Dingledine, R., Hume, R.I., Heinemann, S., J. Neurosci. 12, 4080–4087 (1992)). GluR2, die Untereinheit, welche in Coexpression mit GluR1 oder GluR3 einen Rezeptor mit einer linearen Stromspannungsbeziehung erzeugt, enthält die positiv geladene Aminosäure Arginin (Arg, R) an Position 586. Wird diese Aminosäure durch die neutrale Aminosäure Glutamin (Gln, Q) ersetzt, resultiert dies in einer Rezeptorkombination GluR1,2 (R586Q) mit einer rektifizierenden anstelle einer linearen Stromspannungskurve. Entsprechend führt der Wechsel der Aminosäure Arginin in Glutamin an der analogen Position in der Rezeptoruntereinheit GluR3 zu einer Rezeptormutante mit einer linearen anstelle von einer rektifizierenden Strom-Spannungsbeziehung. Es wurde untersucht, ob diese Aminosäureposition auch verantwortlich ist für die JSTX-Blockierung.

Fig. 3b und 3c zeigen, daß die Wildtyp-Rezeptorkombination GluR1,3 durch das Toxin blockiert wurde, jedoch die Rezeptormutantenkombination GluR1,3 (Q590R) nicht beeinflußt war. Diese Beobachtung befindet sich in Übereinstimmung mit der Hypothese, daß JSTX mit einer Stelle auf den AMPA/KA-Rezeptorkanälen in Wechselwirkung tritt, die direkt mit dem Kanal verbunden ist und die Ionenpermeationseigenschaften bestimmt.

## DE 42 39 816 A1

Im Detail ist in Fig. 3 folgendes gezeigt: Fig. 3: Schematische Zeichnung der Primärstrukturen von GluRs. Die Aminosäuresequenz der vermutlichen Transmembranregionen M2 werden gezeigt für GluR1 – GluR6. Identische Aminosäuren sind eingerahm, die Aminosäurepositionen, welche kritisch sind für die JSTX-Blockierung, sind mit einem Pfeil markiert. Die Aminosäurepositionen geben die Zahl der ersten und letzten gezeigten Aminosäuren an.

Fig. 3b zeigt im oberen Bereich Stromspuren, welche induziert wurden durch 300 µM KA (links) und nach Anwendung von 300 µM KA, 0,5 µM JSTX (rechts) für die Rezeptorkombination GluR1,3. Für diese Oocyte wurde die mRNA injiziert mit einem Verhältnis von GluR1:GluR3 von 1 : 1. Im unteren Teil ist die Strom-Spannungsbeziehung der Untereinheitskombination GluR1,3 für Membranpotentiale zwischen -100 mV und +60 mV gezeigt.

Fig. 3c zeigt im oberen Bereich Ströme, die erhalten wurden von Oocyten, welche die Mutantenuntereinheitskombination GluR1,3 (Q590R) (exprimiert bei einem mRNA-Verhältnis 1 : 2) nach Anwendung von 300 µM KA (links) und KA, 0,5 µM JSTX (rechts) exprimieren. Im unteren Teil ist die Stromspannungskurve für die Mutantenuntereinheitskombination GluR1,3 (Q590R) in Abwesenheit des Toxins gezeigt. Alle Datenpunkte in den Stromspannungskurven wurden gegenüber den Background-Strömen der Oocyten, welche kleiner als 100 nA waren, korrigiert. Die verwendeten Aminosäure-Abkürzungen sind: A: Alanin, C: Cystein, D: Aspartat, E: Glutamat, F: Phenylalanin, G: Glycin, I: Isoleucin, L: Leucin, M: Methionin, N: Asparagin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arginin, S: Serin, T: Threonin, V: Valin, W: Tryptophan.

Auch zu diesem Beispiel durchgeführte parallele Versuche mit NSTX und Argiotoxin zeigen analoge Ergebnisse.

## Patentansprüche

1. Verwendung eines Toxins aus der Gruppe Joro Spider Toxin (JSTX), Spider Toxin NSTX und Argiotoxin zur reversiblen Hemmung oder Verlangsamung der glutamatinduzierten synaptischen Erregungsübertragung im zentralen Nervensystem von Säugetieren.
2. Verwendung eines Toxins aus der Gruppe Joro Spider Toxin (JSTX), Spider Toxin NSTX und Argiotoxin zur pharmakologischen Unterscheidung verschiedener Unterarten von Glutamat-Rezeptorkanälen vom AMPA/Kainat-Typ.
3. Verwendung eines Toxins aus der Gruppe Joro Spider Toxin (JSTX), Spider Toxin NSTX und Argiotoxin zur pharmakologischen Hemmung hoch Kalzium-permeabler AMPA/KA-Rezeptorkanäle.
4. Arzneimittel zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems, dadurch gekennzeichnet, daß es als wirksames Agens mindestens ein Toxin aus der Gruppe Joro Spider Toxin (JSTX), Spider Toxin NSTX und Argiotoxin zusammen mit üblichen pharmazeutischen Träger- und Hilfsstoffen enthält.

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

19/04/01

15:08

KILBURN & STRODE → HALE&DORR BOST.

NO. 125

008

- Leerseite -

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer:

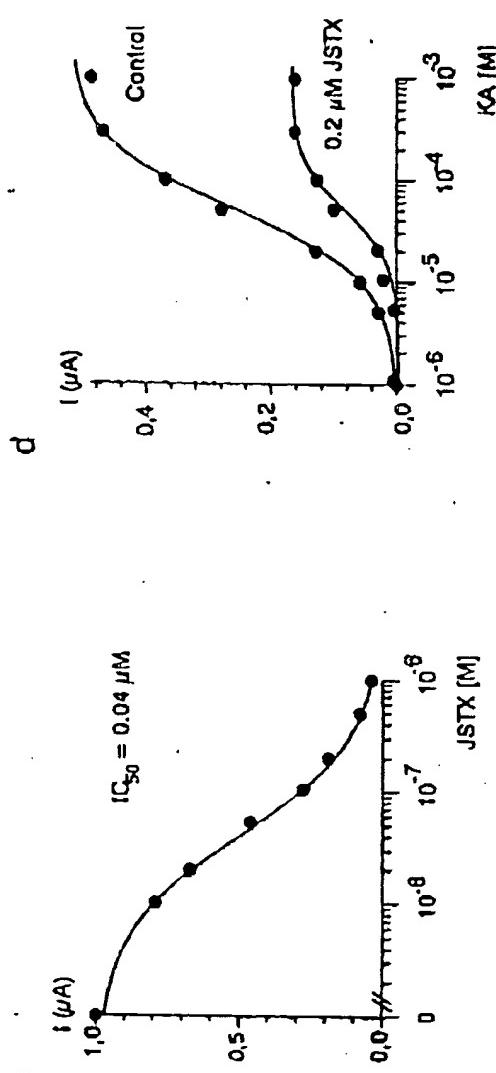
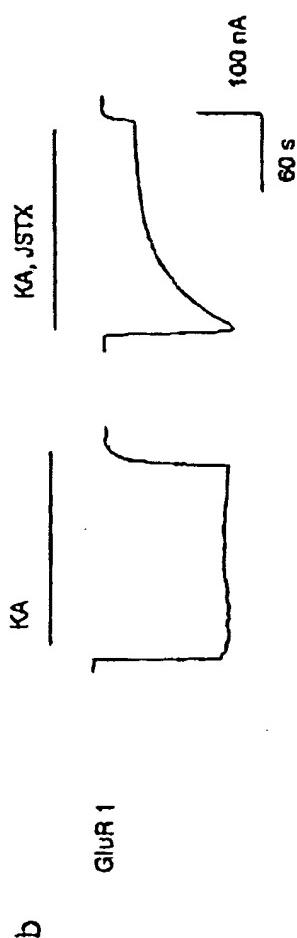
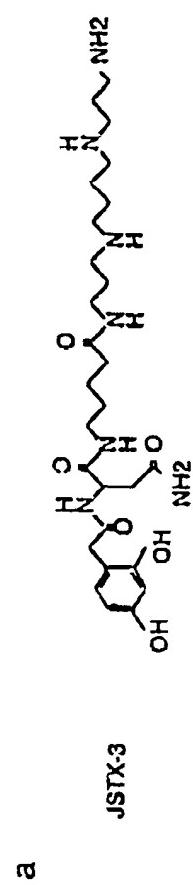
Int. Cl. 6:

Offenlegungstag:

DE 42 39 818 A1

A 61 K 37/02

1. Juni 1994



FIGUR 1

408 022/109

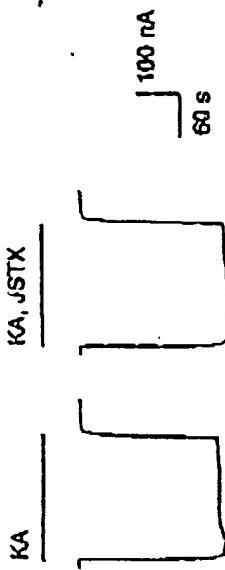
ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:  
Int. Cl. 5:  
Offenlegungstag:

DE 42 39 616 A1  
A 61 K 37/02  
1. Juni 1994

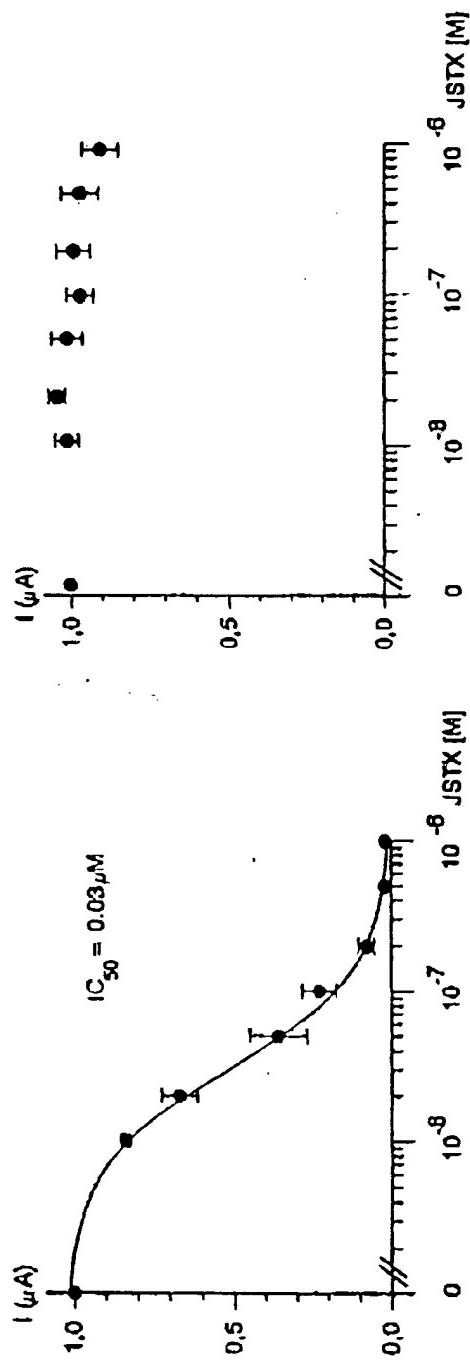
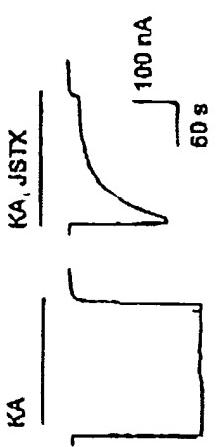
GluR 1, 2 -

G



GluR 3

a



FIGUR 2

408 022/108

## ZEICHNUNGEN SEITE 3

Nummer:

DE 42 39 816 A1

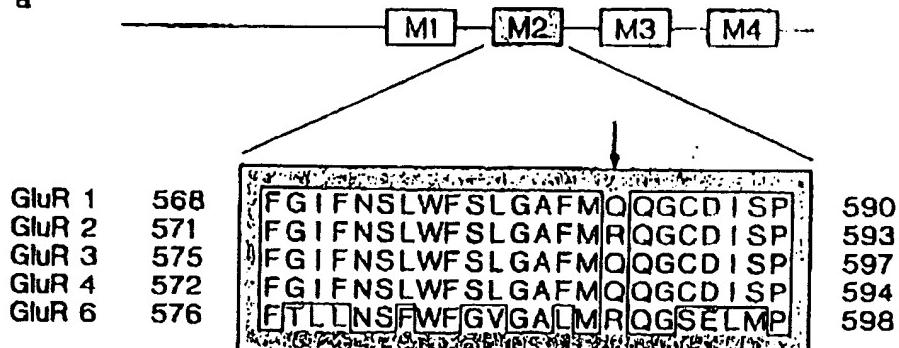
Int. Cl. 5:

A 81 K 37/02

Offenlegungstag:

1.Juni 1994

a

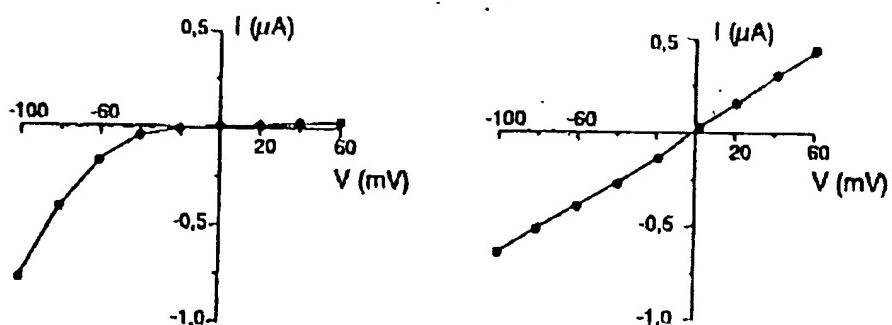
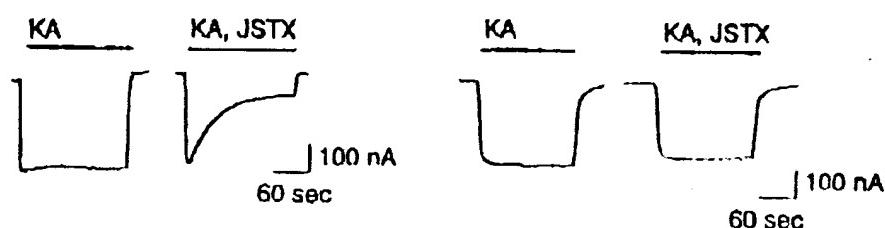


b

GluR 1,3

c

GluR 1,3 (Q590R)



FIGUR 3